

EXTRAÇÃO DE RNA DE BIÓPSIAS DE GLÂNDULA MAMÁRIA E DE CÉLULAS DO LEITE PARA DETECTAR A EXPRESSÃO DE κ -CASEÍNA EM BOVINOS

Ana Paula F. *Serrão-Semenssato*¹, Marina D. *Tambasco*¹, Márcia C.S. *Oliveira*², Antonio P. *Novaes*², Luiz L. *Coutinho*³, Luciana C.A. *Regitano*²

¹Departamento de Genética e Evolução – UFSCar. São Carlos, SP.

²Embrapa Pecuária Sudeste. Caixa Postal 339
CEP 13560-970, São Carlos, SP

³Departamento de Zootecnia – ESALQ/USP. Piracicaba, SP

RESUMO

Com a finalidade de desenvolver um método de análise da expressão de genes no tecido mamário, amostras de biópsias de glândula mamária e de leite foram submetidas à extração de RNA total. A presença de transcritos específicos foi investigada pela detecção do RNA mensageiro de κ -caseína utilizando a reação em cadeia da polimerase a partir de DNA complementar (RT-PCR). A quantidade de RNA total obtido foi suficiente para a detecção de produto de transcrição exclusivo da glândula mamária tanto nas amostras de biópsias quanto nas de leite, sendo essas últimas uma alternativa para aumentar a flexibilidade das análises de expressão nesse tecido. Resultados preliminares sugerem uma maior abundância de transcritos do alelo B desse gene quando comparados aos do alelo A.

INTRODUÇÃO

O polimorfismo das proteínas do leite foi associado a diferenças na qualidade do leite e de suas características de processamento. O queijo produzido com o leite de animais heterozigotos para o alelo B de κ -caseína apresenta maior rendimento do que o produzido com o leite de animais de genótipo AA, pois apresenta maior velocidade de coagulação e uma firmeza maior do coágulo. Os alelos B de κ -caseína e A de β -lactoglobulina influenciam positivamente a concentração de proteína no leite. Estudos realizados com animais heterozigotos para a κ -caseína e β -lactoglobulina demonstraram a existência de maior quantidade das proteínas correspondentes aos alelos B e A de κ -caseína e β -lactoglobulina, respectivamente. No presente trabalho apresentamos um método para extração de RNA a partir de amostras de leite e de biópsias de glândula mamária e posterior identificação de RNAm específicos desse tecido.

MATERIAL E MÉTODOS

Biópsias de aproximadamente 1g de tecido de glândula mamária de 2 fêmeas da raça Canchim em lactação e heterozigotas para o polimorfismo da κ -caseína foram obtidas. O fragmento de tecido foi imediatamente armazenado em nitrogênio líquido para prevenir a degradação do RNA. Amostras de 25 ml de leite de 12 fêmeas da raça Holandesa foram

coletadas no Sistema de Produção de Leite da Embrapa-CPPSE, e levadas imediatamente ao laboratório para extração do RNA. O leite foi centrifugado a 173xg por 10 minutos a 4°C. A gordura e o sobrenadante foram descartados ficando apenas o precipitado de células onde foi adicionado Trizol™ (Gibco) para prosseguir com a extração do RNA total, como descrito a seguir para amostras de biópsia. Um fragmento de aproximadamente 100 mg do tecido foi dissolvido em 750 µl de Trizol™ e 250 µl de água livre de RNase obtida pelo tratamento com dietil pirocarbonato (DEPC). Esse material foi incubado à 30°C por 5 minutos. Após esse período de incubação, foram acrescentados 200 µl de clorofórmio e seguiu-se uma nova incubação de 10 minutos nas mesmas condições de temperatura. O material foi centrifugado à 12.000xg por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa superior foi transferida para um tubo limpo e foi adicionado 500 µl de isopropanol para a precipitação do RNA. Após a precipitação, seguiu-se nova centrifugação a 12.000xg. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 75% em uma centrifugação à 7.500xg por 10 minutos à 4°C. Após secagem, o RNA foi ressuscitado em 50 µl de água livre de RNase. A quantificação do RNA foi obtida em espectrofotômetro modelo Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech). A síntese do cDNA fita simples foi realizada utilizando o kit SuperScript II RT™ (Gibco). Para tal reação foram utilizados 1-5µg de RNA total, 1µl de oligo dT (0,5µg/µl) e água DEPC, incubados a 70°C por 10 minutos. Após a incubação foi preparada uma nova mistura de reação constituída de 2µl de PCR buffer 10X, 2µl de MgCl₂ 25mM, 1µl de dNTP mix 10 mM e 2µl de DTT 0,1 M totalizando um volume de 7µl. Esses 7 µl da mistura de reação foram adicionados em cada mistura RNA/primer e incubadas por 5 minutos a 42°C. Posteriormente, foi adicionado 1µl (200u) da enzima de transcrição reversa SuperScript II RT em cada tubo e incubou-se a 42° por 50 minutos. Uma reação controle foi preparada contendo todos os reagentes exceto a enzima SuperScript II RT para certificar de que o molde da amplificação foi RNA e não DNA. As reações foram interrompidas colocando-se as amostras a 70°C por 15 minutos. Foi adicionado 1µl de RNase H em cada amostra e incubado a 37°C por 20 minutos para que fosse eliminado todo o RNA da amostra e permanecesse só o cDNA. Com a finalidade de detectar a presença de transcritos exclusivos da glândula mamária o cDNA foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando o “primer forward” descrito por Medrano & Aguilar-Cordova (1990) e o “primer reverse” descrito por Zadworny & Kuhnlein (1990), complementares à uma região do exon IV da κ-caseína. Os produtos de PCR foram identificados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% com posterior coloração com nitrato de prata (Comincini et al., 1995). A eletroforese se deu em equipamento para sequenciamento S-2 (Life Technologies, BRL) a 1.300V, 35mA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O RNA extraído das amostras de biópsia de glândula mamária e de leite foi quantificado em espectrofotômetro. A quantidade de RNA obtida das biópsia variou de 10 a 25 µg e a quantidade de RNA obtida de células do leite variou entre 20 e 75 µg, tendo então a extração de RNA de amostras de leite apresentado maior rendimento de RNA total. A identificação de RNAm de κ-caseína foi possível tanto nas amostras de RNA extraídas de biópsias quanto naquelas obtidas a partir de células do leite, demonstrando que apesar do número relativo de células epiteliais mamárias ser reduzido em relação ao total de células presentes no leite, a quantidade de RNA específico é suficiente para a detecção por RT-PCR. Este resultado amplia as possibilidades de estudos da expressão de genes no tecido mamário, pois permite a

coleta de um maior número de amostras, em diferentes estágios da lactação e em lactações sucessivas, o que nem sempre é viável quando da utilização de biópsias.

Resultados preliminares da análise de RNAm transcrito a partir dos alelos A e B do gene da κ -caseína, realizados nos animais heterozigotos, sugerem uma maior abundância de transcritos do alelo B. Esses resultados, se confirmados, podem demonstrar que a diferença no teor de proteína associada à presença do alelo B seja resultante da maior abundância desse RNA mensageiro em relação ao transcrito pelo alelo A, sendo portanto um efeito direto da variação genética nesse loco.

REFERÊNCIAS

- COMINCINI, S.; LEONE, P.; REDAELLI, L.; GIULI, L.; ZHANG, Y.; FERRETTI, L. Characterization of bovine microsatellites by silver staining. *J. Anim. breed. Genet.*, 112: 415-420, 1995.
- MEDRANO, J.F. & AGUILAR-CORDOVA, E. 1990. Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. *Bio-Technology*, 8: 144 – 146.
- ZADWORNY, D. & KUHNLEIN, U. 1990. The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. *Theoretical and Applied Genetic*, 80: 631-634.